

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da citotoxicidade dos nucleotídeos da adenina e o papel do receptor
P2X7 em cultura de células de carcinoma cervical humano

PAOLA DE ANDRADE MELLO

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da citotoxicidade dos nucleotídeos da adenina e o papel do receptor
P2X7 em cultura de células de carcinoma cervical humano

Dissertação apresentada por
Paola de Andrade Mello para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dra. Andréia Buffon

PORTO ALEGRE, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08 de Outubro de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tiana Tasca
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Mello, Paola de Andrade
Avaliação da citotoxicidade dos nucleotídeos da adenina e o papel do receptor P2X7 em cultura de células de carcinoma cervical humano. / Paola de Andrade Mello. -- 2012.
98 f.

Orientadora: Andréia Buffon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Câncer Cervical. 2. Sistema Purinérgico. 3. ATP. 4. P2X7. 5. Alvos Terapêuticos. I. Buffon, Andréia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A estudante não recebeu bolsa de estudos.

Aos meus pais,

a quem devo a vida e a minha formação moral.

Meu reconhecimento e gratidão pelo amor, paciência, compreensão e apoio

constante nesta jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dra. Andréia Buffon, exemplo de profissional competente, dedicado, ético e humano, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, apoio, compreensão e empolgação. Pela amizade e convívio.

As minhas queridas colegas de Laboratório de Bioquímica – Aline, Danielle e Jessica. Agradeço imensamente a todo o apoio, a ajuda e a disponibilidade durante a realização deste trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Ao Eduardo Chiela por todo o apoio, orientação e disponibilidade durante esta etapa. Você foi fundamental no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos professores Alessandra Bruno, Márcia Wink e Guido Lenz e seu grupo de pesquisa pelo apoio, ajuda e troca de experiências.

A todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento desta dissertação, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao Hospital Mãe de Deus, principalmente as minhas colegas Cristina Moraes, Cristiane Giuriatti e Micheli Zeifert, pela ajuda, incentivo e apoio. Permitindo a minha liberação para realização das atividades.

Aos meus pais, Celso e Sirlei, agradeço pela educação, apoio, incentivo, conforto, compreensão e amor incondicional.

Ao Tiago, pelo apoio, amor e compreensão. Por entender a minha ausência em muitos momentos da nossa vida.

RESUMO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e a supressão de mecanismos como apoptose e adesão celular, são fatores importantes na carcinogênese cervical, entretanto, o mecanismo pelo qual as células transformadas pelo HPV resistem a apoptose ainda não está claro. Evidências indicam que a sinalização purinérgica pode ter efeitos tróficos no crescimento e morte celular na epiderme humana, e está relacionada com processos de transformação maligna, como o câncer. O ATP extracelular, em concentrações milimolares, pode induzir apoptose em células tumorais, por meio da ativação dos receptores P2X7. No intuito de compreender o envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento do câncer cervical humano, este estudo avaliou o efeito do ATP extracelular e o envolvimento do receptor purinérgico P2X7 na morte celular da linhagem de câncer cervical SiHa. O tratamento das células com várias concentrações de ATP por 24h mostrou que a concentração de 5mM foi suficiente para causar a morte de cerca de 30% das células. Ainda, o efeito citotóxico do ATP foi tempo dependente, sendo que após 72h de tratamento houve uma redução de 80% na viabilidade celular. Além do efeito citotóxico agudo, o ATP mostrou ser efetivo em inibir a proliferação das células remanescentes após a sua exposição, demonstrando um efeito a longo prazo. Esta morte celular induzida pelo ATP parece ser via mecanismo de apoptose, por meio da ativação dos receptores P2X7. Além disso, foi encontrada uma menor expressão do receptor P2X7 nas células resistentes ao tratamento com ATP, indicando um mecanismo de defesa das células tumorais em relação à apoptose mediada por este receptor. Neste trabalho verificou-se que o sistema purinérgico está intimamente relacionado com os mecanismos de morte e resistência de células tumorais. Considerando esses resultados, o ATP poderá ser um agente antitumoral e o P2X7 um novo alvo para a pesquisa terapêutica do câncer cervical e/ou um possível marcador de agressividade tumoral.

Palavras-chave: ATP, Sistema Purinérgico, Câncer Cervical, P2X7, Alvos Terapêuticos.

ABSTRACT

HPV infection and suppression of cell death mechanisms like apoptosis are the most important factors involving in cervical carcinogenesis. Anyway, the mechanism that leads cells infected by HPV escape to apoptosis remains unknown. Evidences indicate that purinergic system can exert trophic effect on cell growth and death in human epidermis and therefore, it can be related with malignance transformation process, like cancer. Extracellular ATP, at high concentrations, can induce apoptosis on cancer cells through P2X7 activation. Here we intended to understand the involvement of purinergic system on development of human cervical cancer. For that, we studied the extracellular ATP effect and the P2X7 importance on cell death using cervical cancer cell line SiHa. Exposure of cells with increasing concentrations of ATP for 24h showed that 5mM was the concentration sufficient to induce 30% of cell death. Adding, the cytotoxic effect of ATP was time-dependent, leading a decrease of 80% on cell viability after 72h of treatment. Moreover, ATP was effective in inhibiting a single cell to grow into a colony after its exposure, showing a permanent effect on SiHa cells. This induction of cell death, demonstrated by ATP, seems to be through P2X7 receptor by a mechanism that involves apoptosis. Finally, we found that cells resistant to ATP cytotoxic effect showed less expression of P2X7 receptor, indicating a defense mechanism to escape apoptosis. Here we demonstrated that the purinergic system was deeply related with mechanisms of tumor cell death and resistance, making ATP as a possible alternative in cancer treatment and P2X7 as a possible new target on therapeutical research in cervical cancer and/or as a marker of tumor aggressiveness.

KEYWORDS: ATP, Purinergic System, Cervical Cancer, P2X7, Therapeutical Target.

SUMÁRIO

I. Introdução

I.1 Moléculas sinalizadoras.....	19
I.2 Receptores purinérgicos.....	20
I.3 O receptor P2X7.....	21
I.4 O nucleotídeo ATP em células tumorais.....	22
I.5 As ecto-nucleotídes	24
I.6. Ecto-nucleotídes e câncer.....	26
I.7 Câncer cervical e HPV.....	28
I.8 Câncer cervical e o sistema purinérgico.....	31

II. Objetivos.....33

III. Artigo científico

III.1. CAPÍTULO 1 - <u>Paola de Andrade Mello</u>, Eduardo C. Filippi-Chiela, Aline Beckenkamp, Danielle Santana Bertodo, Jessica Nascimento, Luciana N. Calil, Emerson Casali, Alessandra Nejar Bruno, Juliano Pაცეზ, Luiz Fernando Zerbini, Márcia R. Wink, Guido Lenz, Andréia Buffon. ATP induces cell death through P2X7 receptor in human cervical carcinoma cell line.....	39
--	-----------

IV. Discussão geral.....69

V. Conclusões gerais.....81

VI. Perspectivas.....85

VII. Referências.....89

I. Introdução

I.1. Moléculas sinalizadoras

A sinalização celular é fundamental para a manutenção de processos biológicos em sua totalidade. Moléculas sinalizadoras são liberadas constitutivamente por todas as células e tecidos, sem estímulo externo e em resposta a estímulos bioquímicos, mecânicos e/ou físicos. Elas são responsáveis pelo controle de muitos processos fisiológicos, como a vasoconstrição, a contração muscular, a agregação plaquetária, neurotransmissão, entre outros. Mas também são importantes na sinalização de processos patológicos, como na lesão tecidual, onde são percebidas como um sinal do tecido lesionado pelas células da vizinhança para que eventos como a apoptose possam ser iniciados, minimizando os efeitos deletérios (Di Virgilio, 2005; Lazarowski *et al.*, 2011).

Para que uma molécula possa ser candidata à sinalizadora de perigo, esta precisa ser um mensageiro extracelular efetivo. Segundo Di Virgilio (2005), os nucleotídeos extracelulares preenchem todos esses pré-requisitos: estão presentes em altas concentrações intracelularmente (ATP 5-10mM, UTP 0,5-1mM) e são rapidamente liberados depois de morte ou dano celular, ou até mesmo depois de simples estímulo mecânico; a concentração extracelular de ATP sob condições basais é de 1-10nM; todas as células expressam ectoenzimas na membrana plasmática que rapidamente hidrolisam os nucleosídeos tri-, di- e monofosfatados.

Os nucleotídeos extracelulares purínicos (ATP, ADP e o nucleosídeo adenosina) e pirimidínicos (UTP e UDP) constituem uma classe de moléculas de sinalização, as quais são conhecidas por regular uma ampla variedade de efeitos biológicos mediados por diferentes receptores no espaço extracelular. Para promover esses efeitos, uma série de mecanismos e interações entre diferentes moléculas são necessários. Após um estímulo celular, os nucleotídeos podem ser liberados para o meio extracelular por meio de três mecanismos: (1) exocitose, em vesículas granulares intracelulares (2) via secretória, por meio da formação de vesículas derivadas do Retículo

Endoplasmático/ Complexo de Golgi e (3) via transportadores de membrana, por meio dos canais de conexinas, panexinas e canais iônicos. No meio extracelular, os nucleotídeos interagem com receptores específicos, denominados purinoceptores e em seguida são rapidamente hidrolisados por enzimas denominadas ecto-nucleotidases (Lazarowski *et al.*, 2011). Ao interagir com os purinoceptores, os nucleotídeos desencadeiam uma série de reações intracelulares que resultam em um efeito tecido-específico. Dentre os efeitos promovidos por essas moléculas pode-se incluir a contração do músculo liso, a neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico, a secreção exócrina e endócrina, a resposta imune, a inflamação, a agregação plaquetária, a dor, a modulação da função cardíaca, a proliferação, a diferenciação, a apoptose, entre outras (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock, 2006). Além disso, uma atividade anticâncer dos nucleotídeos da adenina foi primeiramente descrita por Rappaport (1983) e desde então, muitos estudos têm sugerido um potencial terapêutico do ATP e outros nucleotídeos extracelulares no tratamento do câncer (Burnstock, 2002; White & Burnstock, 2006).

I.2. Receptores purinérgicos:

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares são mediados por receptores presentes na superfície das membranas celulares. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores de adenosina ou P1, e receptores P2, ativados por ATP, ADP, UTP e UDP (Figura 1).

Os receptores P1 se subdividem em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 e são ativados por adenosina. Os receptores P2 podem ser classificados em duas famílias: receptores P2X e P2Y. Os receptores P2X atuam como canais ionotrópicos ativados por ATP e estão divididos em sete subtipos (P2X1-7). Os receptores metabotrópicos P2Y são acoplados a proteínas G e estão divididos nos subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (Ralevic & Burnstock, 1998; Von Kugelgen & Wetter, 2000; Communi *et al.*, 2001; Hollopeter *et al.*, 2001).

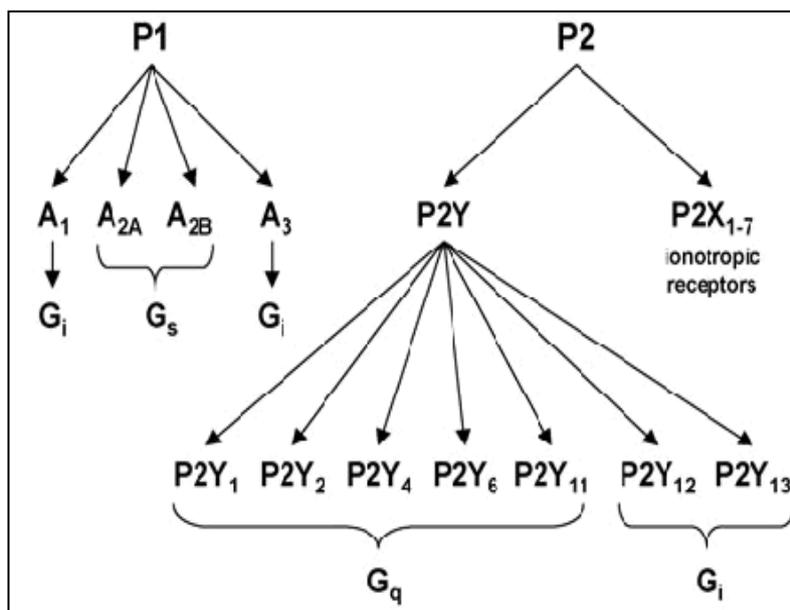


Figura 1. Receptores de nucleotídeos e seus efetores. Os receptores P1 são ativados por adenosina e os P2 por ATP, ADP, UTP e UDP. Os receptores ionotrópicos (P2X) formam canais ativados por ligantes. Já os receptores metabotrópicos (P1, P2Y) são acoplados a proteína G que estimula a fosfolipase C (Gq) e estimula (Gs) ou inibe (Gi) a adenilato ciclase. Adaptado de Czajkowski e Baranska (2002). Cópia autorizada por *Acta Biochimica Polonica*.

Diferentes subtipos de receptores P2, como os receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2X₁, P2X₄, P2X₅ e P2X₇, têm sido identificados em muitos tipos de câncer, tanto em amostras de tecido tumoral de humanos quanto em linhagens celulares (White & Burnstock, 2006; Burnstock *et al.*, 2012).

I.3. O receptor P2X7:

Dentre os receptores purinérgicos, o receptor P2X7 possui algumas peculiaridades, as quais incluem, responder a concentrações altas de ATP (acima de 1 mM) e abrir poros que permitem a passagem de moléculas de até 900 Da, o que é aceito como o principal mecanismo de indução de apoptose por altas concentrações de ATP extracelular por meio deste receptor (Ferrari *et al.*, 1999).

Estudos recentes sugerem que os receptores P2X são expressos em queratinócitos humanos e em carcinoma de células escamosas, e podem mediar efeitos tróficos (Greig *et al.*, 2006). Baseado nestes estudos, o receptor

P2X7 tem sido envolvido na indução de apoptose por ATP (Coutinho-Silva *et al.*, 1999; Di Virgilio *et al.*, 2001), um importante mensageiro local na epiderme. Em epiderme humana e culturas primárias de queratinócitos (Greig *et al.*, 2003a) tem sido sugerido que o receptor P2X7 faz parte da maquinaria do estágio terminal de diferenciação/apoptose destas células. Além disso, a expressão deste receptor está alterada em células de carcinoma basal e carcinoma escamoso. Experimentos em células A431 de carcinoma escamoso têm indicado que os receptores purinérgicos podem, no futuro, ser alvos terapêuticos em câncer de pele não-melanoma (Greig *et al.*, 2003b).

I.4. O nucleotídeo ATP em células tumorais

O ATP exerce influência sobre o sistema vascular, onde pode interferir no processo de agregação plaquetária, mediar vasoconstrição via receptores do subtipo P2X₁ e promover proliferação de células musculares lisas e células endoteliais (Ralevic & Burnstock, 2003). Além de respostas fisiológicas, o ATP extracelular também pode desencadear respostas patológicas dependendo do receptor ativado. A ativação dos receptores P2Y₂ e P2Y₄ desencadeia processos como proliferação celular, já a ativação do receptor P2X7, está relacionada com morte celular (Harada *et al.*, 2000).

A indução de apoptose parece exercer uma importante função na atividade anticâncer descrita para o ATP (Abbracchio & Burnstock, 1998). Alguns autores têm proposto que este nucleotídeo permeabiliza a membrana celular e induz morte celular programada em vários sistemas de células tumorais *in vitro*, incluindo seu envolvimento na morte de células tumorais mediada via linfócitos T ativados (Di Virgilio *et al.*, 1990). Com base nestes estudos, o ATP pode ser considerado um mediador citotóxico, podendo ser secretado por linfócitos, ativados por algum estímulo, e estes mesmos linfócitos poderiam se proteger da morte celular induzida por ATP, aumentando a expressão de ecto-nucleotidases na membrana celular (Filippini *et al.*, 1990).

Além disso, o ATP extracelular, dependendo da concentração, tem se mostrado citotóxico ou mesmo um inibidor do crescimento para várias linhagens de células de mamíferos, tais como fibroblastos transformados de ratos (Weisman *et al.*, 1988), células de linfomas, células leucêmicas (Spranzi *et al.*, 1993), células tumorais pancreáticas, mamárias e epiteliais (Rapaport, 1983). O mecanismo molecular pelo qual o ATP extracelular exerce seus efeitos de toxicidade ainda não está bem definido, mas acredita-se que sejam mediados por ativação de purinoceptores P2X7.

Dois estudos recentes demonstraram a ação citotóxica do ATP extracelular em linhagens celulares de glioma, via ativação do receptor P2X7 (Tamajusuko *et al.*, 2010; Gehring *et al.*, 2012). O primeiro, utilizando a linhagem GL261, demonstrou que o ATP extracelular, em altas concentrações, induziu morte celular por necrose e ainda, verificou que o silenciamento do gene do receptor P2X7 levou a uma queda significativa na morte celular induzida pelo ATP. Já o segundo, utilizando as linhagens U-138 MG, U-251 MG e M059J, demonstrou que as linhagens U-138 MG e U-251 MG, resistentes a radiação ionizante gama, também eram resistentes à morte celular induzida pelo ATP 5mM, o que se justificou pela menor expressão proteica e RNAm do receptor P2X7 encontrados nessas células. Já a linhagem M059J, radiosensível, apresentou uma redução significativa na viabilidade celular quando exposta ao ATP, sendo esta morte, provocada por apoptose via ativação do receptor P2X7.

Outro estudo, utilizando a linhagem celular de glioma U87, verificou que o ATP extracelular promove uma redução significativa no número de esferas celulares, que contém sabidamente um acúmulo de células-tronco tumorais (Ledur *et al.*, 2012). Estas estão envolvidas em processos de malignidade e recorrência de tumores e, portanto, alternativas terapêuticas que inibam a sua formação e o seu desenvolvimento são extremamente necessárias. Desta forma, uma vez que o ATP exibe efeitos citotóxicos em células tumorais e em células-tronco tumorais, pode ser considerado um composto importante para a modulação do desenvolvimento tumoral e pode apresentar uma aplicação futura como uma terapia alternativa no tratamento do câncer.

Por outro lado, dados da literatura também têm mostrado que nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares induzem proliferação em linhagens de gliomas, em baixas concentrações (Morrone *et al.*, 2003). O nucleotídeo ATP pode ser liberado para o meio extracelular por morte de células normais e por injúria causada pela ressecção do tumor. O tumor induz, por meio da morte de células normais, a liberação de mais ATP que estimula sua própria multiplicação e, como consequência, a morte de outras células, abrindo espaço a ser ocupado pelas células tumorais e liberando mais ATP, para continuar o processo invasivo (Morrone *et al.*, 2006). Desta forma, a presença de enzimas que metabolizam ATP nas células tumorais podem causar uma diminuição no crescimento e na proliferação destas células e podem agir como moléculas alvo no tratamento de tumores.

I.5. As ecto-nucleotidases:

A ação fisiológica induzida pela sinalização purinérgica é regulada por uma série de ecto-nucleotidases, incluindo membros das famílias das E-NTPDases (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases) e das E-NPPs (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases) (Zimmermann, 2001) (Figura 2).

A família das NTPDases é constituída, até o presente momento, por oito membros (NTPDases1-8) clonados e caracterizados (Zimmermann, 2001). As NTPDases1, 3 e 8 são ligadas à membrana plasmática e hidrolisam os nucleosídeos trifosfatados (NTPs) tão eficientemente quanto os difosfatados (NDPs). A NTPDase2 (ecto-ATPase), também ligada à membrana plasmática, possui alta afinidade pelos NTPs, hidrolisando apenas marginalmente os NDPs. As NTPDases5, 6 e 7 são enzimas intracelulares com preferência quase exclusiva pelos NDPs. As NTPDases tem sido descritas em uma variedade de organismos, incluindo plantas e invertebrados até tecidos de mamíferos, sendo implicadas tanto em processos fisiológicos como patológicos.

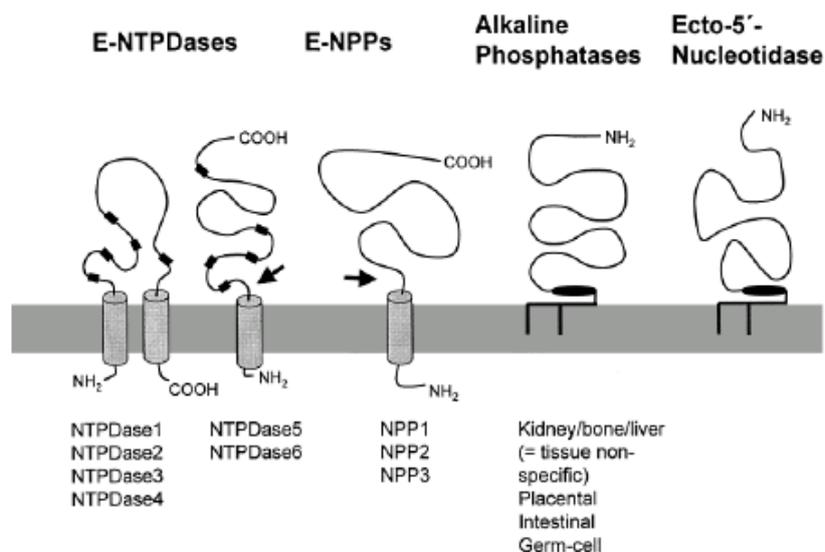


Figura 2: Topografia de membrana proposta para as ecto-nucleotidasas. As NTPDases de 1 a 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. NTPDase 5 e NTPDase 6 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada (seta). As NTPDases de 4 a 6 são localizadas intracelularmente. Os quadros escuros na sequência das NTPDase 1 a 6, representam as regiões conservadas das apirases (ACR). Todas as ectonucleotidasas representadas são glicoproteínas. Cópia autorizada por Zimmermann, 2001.

A ecto-5'-nucleotidase (“lymphocyte surface protein CD73”) é uma enzima ancorada à membrana plasmática por glicosil-fosfatidilinositol (GPI), que representa um marcador de maturação para os linfócitos T e B, sendo ausente nas células imaturas (Airas *et al.* 1997). Esta enzima encontra-se presente na maioria dos tecidos e sua principal função é a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, a seus respectivos nucleosídeos. O principal papel fisiológico atribuído a ecto-5'-nucleotidase, é a formação de adenosina a partir do AMP extracelular e a subsequente ativação dos receptores P1 (Brundege & Dunwidie, 1997), enquanto que em sistema vascular, resulta em vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária (Kawashima *et al.*, 2000). Além disso, a ecto-5'-nucleotidase pode estar envolvida na adesão celular (Zimmermann, 2001).

Os membros da família E-NPP (Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) possuem uma ampla distribuição tecidual e incluem a NPP1(PC-1), NPP2 (PD-Ia, autotaxina), NPP3 (PD-Ib, B10,

gp130RB13-6), NPP4, NPP5, NPP6 e NPP7 (esfingolielinase alcalina). Três dos sete membros desta família, as NPPs 1-3 são conhecidas por hidrolisar nucleotídeos (Stefan *et al.*, 2006).

Essas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande variedade de substratos, entre eles purinas e pirimidinas. O p-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (p-nitrophenyl-TMP) tem sido usado como um substrato artificial, específico para as E-NPPs (Sakura *et al.*, 1998). A catálise por NPPs afeta processos como proliferação e motilidade celular, angiogênese, mineralização óssea e digestão. Estão também envolvidas na patofisiologia do câncer, resistência à insulina e alterações na calcificação (Stefan *et al.*, 2005).

I.6. Ecto-nucleotidases e câncer:

Alterações na atividade, distribuição e expressão das NTPDases têm sido descritas em várias condições patológicas incluindo o câncer, que por sua vez, levam à alterações nos níveis de nucleotídeos extracelulares, podendo favorecer o desenvolvimento de tumores.

Dados da literatura mostram uma alta expressão da NTPDase 2 ou CD39L1, uma E-NTPDase caracterizada por hidrolisar preferencialmente os nucleosídeos tri-fosfatados (Zimmermann, 2001), em alguns tumores (Saphner *et al.*, 1991; Knowles and Chiang, 2003). Portanto, a presença da NTPDase 2 pode representar um eficiente meio pelo qual as células tumorais evitam os efeitos citotóxicos do ATP.

A participação da NTPDase 1 também tem sido descrita em vários tipos de células tumorais, tais como linhagens de melanoma humano, células tumorais de ovário de ratas, câncer de pâncreas humano e carcinoma de mama (Dzhandzhugazyan *et al.*, 1998; Kittel *et al.*, 2000; Kittel *et al.*, 2002). Em melanomas diferenciados de humanos foi observado um aumento na expressão da ecto-apirase/39, sugerindo que esta proteína pode ser um

marcador de diferenciação tumoral, por apresentar gradual diminuição com a progressão do tumor (Dzhandzhugazyan *et al.*, 1998).

A atividade da ecto-5'-nucleotidase em células tumorais também tem sido descrita e é bastante variável. Uma atividade elevada desta enzima foi encontrada em carcinoma de mama (Canbolat *et al.*, 1996), câncer pancreático (Floke & Mannherz, 1991) em glioblastoma (Fenoglio, 1997), entre outros. Estudos demonstram que a alta expressão da ecto-5'-nucleotidase em diferentes células de melanomas está associada com um fenótipo altamente invasivo. Além de gerar adenosina, ela pode ter outras funções em melanomas, tais como adesão e interação com componentes da matriz extracelular (Sadej *et al.*, 2006). Além disso, também tem sido especulado, o envolvimento da enzima na resistência a drogas e no desenvolvimento tumoral. A enzima também tem sido utilizada como um marcador em leucemias e em funções específicas, durante o desenvolvimento celular (Gutensohn *et al.*, 1993; Ujhasy *et al.*, 1996).

Até o momento, as NPPs mais bem estudadas e caracterizadas são as ecto-enzimas de mamíferos, NPP1, 2 e 3. A NPP3 tem sido descrita como promotora de invasão tumoral, e está associada com a carcinogênese do câncer de cólon humano (Yano *et al.*, 2003). Além disso, está envolvida na infiltração de células neoplásicas de carcinoma ductal de bile (Yano *et al.*, 2004). O aumento dos níveis desta enzima na forma solúvel, em soro de pacientes com estas duas neoplasias sugere um possível papel como marcador das mesmas (Yano *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2004). A NPP2 também tem sido detectada em muitos tumores, incluindo carcinoma hepatocelular, neuroblastoma, carcinoma prostático, câncer de pulmão (Goding *et al.*, 2003). Esta enzima foi identificada pela primeira vez em um meio condicionado de células de melanoma, como uma proteína estimulante da motilidade tumoral, foi denominada de autotaxina (Stracke *et al.*, 1992). Em células NIH3T3 *ras*-transfectadas, a NPP2 aumenta o potencial invasivo e metastático além de apresentar propriedades angiogênicas (Nam *et al.*, 2001). Ainda, esta enzima é secretada por vários tipos de células tumorais, incluindo câncer de pele,

pulmão e mama (Stefan *et al.*, 2006). Os efeitos estimulatórios da NPP2 no crescimento e motilidade de tumores têm sido atribuídos à sua habilidade em produzir ácido lisofosfatídico (LPA) (Stefan *et al.*, 2006). Entretanto, estes efeitos também podem ser devido à sua habilidade de hidrolisar nucleotídeos.

I.7. Câncer cervical e HPV

O câncer da cérvix uterina é a terceira neoplasia mais frequente em mulheres no mundo todo, sendo uma das principais causas de morte. A detecção do câncer, em seus estágios iniciais pode poupar a vida da paciente, visto que a sobrevivência ao câncer da cérvix uterina depende fortemente do estágio em que a doença se encontra ao diagnóstico (Hartmann *et al.*, 2002). As mais recentes estimativas mundiais apontaram 529 mil casos novos desse câncer em mulheres no ano de 2008. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. No Brasil, atualmente, esta patologia detém o segundo lugar em incidência e o quarto em mortalidade e são esperados para o ano de 2012, 17.540 casos novos de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

O papilomavírus humano (HPV) é um agente infeccioso transmitido principalmente por via sexual e sua vinculação com o desenvolvimento de uma variedade de lesões pré-malignas e câncer cervical já é bem estabelecida (Liu *et al.*, 2000). Mais de 100 subtipos de HPV têm sido identificados (Woodman *et al.*, 2007) e de acordo com seu potencial oncogênico, os subtipos de HPV são classificados em três grupos: de baixo, médio e alto risco (Figura 3).

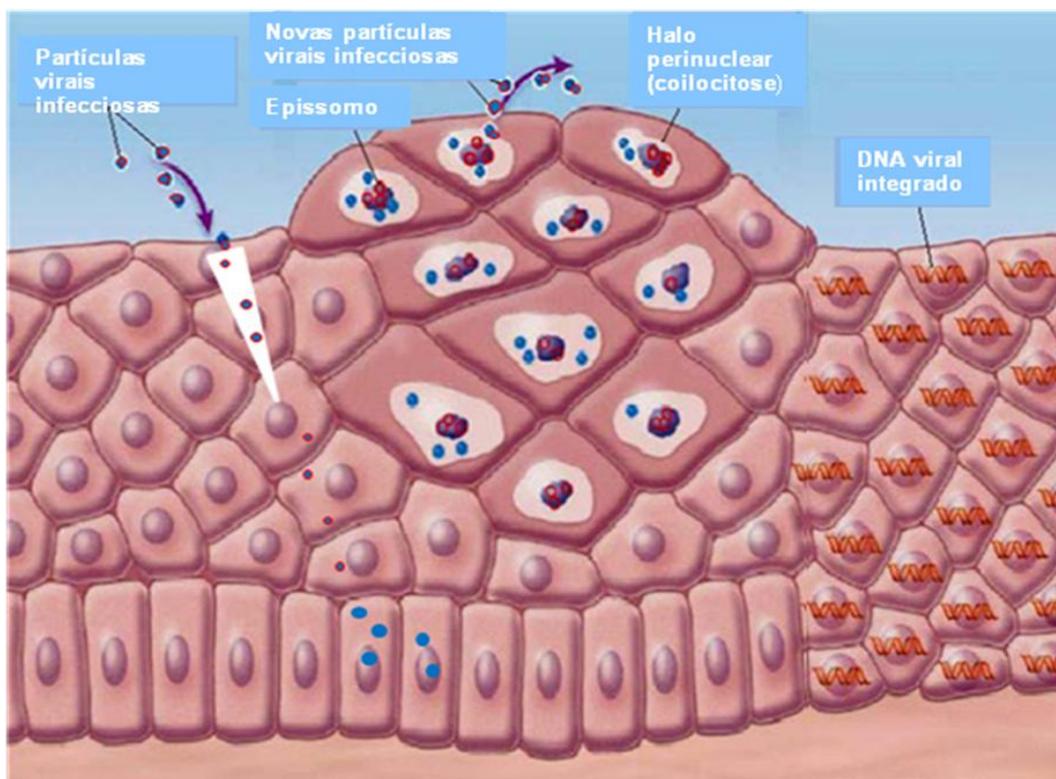


Figura 3. Carcinogênese cervical pelo HPV. Infecção dos queratinócitos pelo HPV e replicação do DNA viral. Uma fração significativa de HPV de alto risco integra o seu DNA ao cromossomo do hospedeiro, com perda de E2, superexpressão de oncogenes virais E6 e E7 e instabilidade genômica. Estes cânceres são tratados com quimioterapia, radioterapia e cirurgia, porém com sucesso limitado. Cópia com permissão de Goodman, A. & Wilbur, D.C., 2003, *Copyright Massachusetts Medical Society*.

Os HPVs de alto risco são ligados ao surgimento de 95% dos carcinomas cervicais, tais como os HPV 16 e 18, que são os mais frequentemente detectados (Roden & Wu, 2006). As propriedades transformantes dos HPVs de alto risco estão relacionadas aos genes E6 e E7. Em lesões malignas, associadas ao HPV 16 e 18, o DNA viral permanece integrado ao cromossomo do hospedeiro. Para possibilitar tal integração, ocorre uma quebra no genoma viral, geralmente, nas regiões E1 e E2 do vírus, com perda das funções destes genes e aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 (Duggan, 2002). As proteínas codificadas por estes genes interferem na atividade inibitória do crescimento celular exercido pelos genes supressores de tumor (Tjalma *et al.*, 2004). A oncoproteína E6 leva à degradação e inativação do produto do gene supressor de tumor p53, inibindo

apoptose, e a oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb), a qual inibe a progressão do ciclo celular (Lorenzatto *et al.*, 2005).

A habilidade da proteína E6 de se associar com o supressor de tumor p53 tem sido sugerida como um mecanismo pelo qual o HPV induz tumorigênese (Rapp & Chen, 1998). Entretanto, essa degradação da proteína p53 parece não ser o único mecanismo pelo qual a proteína E6 inibe a apoptose. Estudos utilizando células que não expressam a proteína p53 demonstram que E6 inibe esse processo por uma via independente, bloqueando e degradando proteínas chaves das vias intrínsecas e extrínsecas das caspases. Sendo assim, a proteína E6 é responsável por prevenir a morte celular, bloqueando outros mediadores intrínsecos envolvidos na apoptose, além da p53 (Howie *et al.*, 2009).

O processo de apoptose serve para eliminar dano celular, crescimento aberrante e células infectadas por vírus, que poderiam ser uma ameaça à sobrevivência de um organismo. Acredita-se que defeitos neste processo têm uma função tanto no desenvolvimento de malignidade quanto na resistência à quimioterapia (Rodriguez-Nieto & Zhivotovsky, 2006). Enquanto a redução da apoptose está relacionada com o carcinoma cervical, seu aumento tem sido observado em lesões intra-epiteliais precursoras desta patologia (Chung *et al.*, 2002).

Embora a atividade anti-apoptótica da proteína E6 do HPV tenha sido descrita em cultura de células, esta proteína pode também induzir ou sensibilizar as células à apoptose (Rapp & Chen, 1998). Esse efeito contraditório parece estar relacionado com a presença de isoformas da proteína E6, conhecidas por E6*, que apresentam uma cadeia proteica menor e que podem interagir com E6 e formar complexos com novas funções. O nível da expressão da proteína E6 e a relação entre E6 e suas isoformas (E6*) são os principais fatores que irão determinar o efeito final na célula, proteção ou sensibilização a apoptose. O mecanismo pelo qual a célula se torna sensível à

apoptose parece ser devido à ligação entre E6* e E6, inibindo, desta forma, a degradação da p53 (Filippova *et al.*, 2009).

Além de inativar a p53 e bloquear a apoptose, a proteína E6 promove alterações na adesão, polaridade e diferenciação celular das camadas epiteliais da epiderme. Durante esse processo, a proteína E6 degrada uma série de proteínas importantes para o processo de diferenciação terminal celular a fim de permitir a proliferação celular e consequente replicação viral (Howie *et al.*, 2009).

I.8. Câncer cervical e o sistema purinérgico

Em relação à gênese de um processo neoplásico, constata-se que alterações em processos intrínsecos como proliferação, diferenciação, morte celular programada e capacidade de controle do micro ambiente, são características que levam ao sucesso do câncer em detrimento do organismo saudável. Desta forma, a análise da proliferação celular e dos eventos relacionados à apoptose, são ferramentas importantes para conhecer o comportamento das células tumorais (Wang *et al.*, 2004).

Muitas evidências indicam que a sinalização purinérgica pode ter efeitos tróficos no crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular na epiderme humana (Abbracchio & Burnstock, 1998; Burnstock, 2002). Está também descrito na literatura, que altas concentrações de ATP extracelular podem induzir morte celular em diferentes tipos de células (Morrone *et al.*, 2005; Di Virgilio, 2000), inclusive podendo ser citotóxico para células tumorais, e este efeito parece ser mediado principalmente via ativação de receptores P2X7 (Harada *et al.*, 2000; Wen & Knowles, 2003). A expressão por imunistoquímica do receptor P2X7 em queratinócitos normais e transformados por HPV, foi descrita por Greig *et al.* (2006). Recentemente, foi demonstrado que em células epiteliais cervicais humanas a apoptose é mediada pelo receptor P2X7, e o tratamento destas células com apirase (CD39), atenuou esta morte celular, sugerindo que o ATP extracelular e mecanismos

envolvendo o sistema purinérgico podem controlar a apoptose nestas células (Wang *et al.*, 2004). Portanto, seria interessante avaliar a expressão deste receptor em células de carcinoma cervical, uma vez que um dos mecanismos que leva ao desenvolvimento desta neoplasia é o bloqueio da apoptose, com consequente imortalização das células tumorais.

Além disso, estudos realizados em carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas humanas indicaram um alto nível de expressão do receptor P2X7 em tumores moderadamente agressivos, enquanto que em tumores mais agressivos esta expressão está reduzida. Esta diminuição na expressão do receptor P2X7 sugere que este receptor possa ser um marcador de agressividade tumoral (Greig *et al.*, 2003b). Entretanto, o papel deste receptor em células de carcinoma cervical ainda não está totalmente esclarecido.

II. Objetivos

Tendo em vista o envolvimento do sistema purinérgico em diversos processos de transformação maligna, em diferentes células, este projeto teve como objetivo geral, estudar o envolvimento dos nucleotídeos da adenina bem como do receptor purinérgico P2X7 em linhagens celulares de carcinoma cervical humano.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Analisar a expressão e a distribuição do receptor P2X7, por meio da técnica de RT-PCR, *real-time* PCR e Western Blot, em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), em comparação com linhagem de queratinócitos normais imortalizados (HaCaT).
2. Avaliar o efeito dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP), do nucleosídeo adenosina e do agonista de receptor P2X7, BenzoilATP (BzATP), na viabilidade celular, utilizando o ensaio com MTT e a contagem celular, em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa).
3. Investigar os mecanismos de morte celular induzida pelos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP), do nucleosídeo adenosina e do agonista de receptor P2X7, BenzoilATP (BzATP), por meio da avaliação do processo de apoptose e necrose, utilizando marcadores específicos como anexina V, iodeto de propídio e ainda da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa).

III. Artigo Científico

Manuscrito a ser submetido a um periódico da área, após realização de experimentos complementares no início do doutorado.

RESUMO:

Introdução: Nucleotídeos de adenina podem ser citotóxicos para células tumorais dependendo da sua concentração no meio extracelular. Dentre eles, o ATP extracelular parece exercer efeito citotóxico por meio do mecanismo de apoptose, via receptor P2X7.

Objetivo: Nesse trabalho, nós avaliamos o efeito dos nucleotídeos de adenina na morte celular da linhagem de câncer cervical SiHa.

Métodos: A linhagem celular SiHa (ATCC) foi tratada com 5mM de ATP por 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi determinada utilizando os métodos do MTT, do ensaio clonogênico e da contagem celular com Tripan Blue. A determinação de dano celular foi feita através do método da dosagem da LDH no meio extracelular e a confirmação do mecanismo de morte celular induzido pelo ATP, por necrose ou apoptose, foi verificado por meio da marcação dupla das células com anexina V/IP e posterior quantificação por citometria de fluxo. O efeito do agonista seletivo do receptor P2X7, BzATP, e do antagonista não seletivo deste receptor, oATP, na morte celular, também foi avaliado. A determinação da quantidade de RNAm e da expressão proteica do receptor P2X7 foi realizada pelas técnicas de RT-PCR, Real time PCR e Western Blot.

Resultados: Os métodos do MTT, da contagem celular e do ensaio clonogênico mostraram que o ATP 5mM apresenta efeito citotóxico tempo dependente, ocorrendo uma redução de 80% na viabilidade celular após 72h de tratamento. Além disso, somente após 72h houve uma liberação significativa, mas pequena da LDH. A marcação dupla das células com anexina V/IP mostrou que o ATP 5mM induz a morte celular por apoptose, não necrose. BzATP na concentração 100µM reduziu a viabilidade celular em 50% e o oATP conseguiu inibir significativamente, mas parcialmente a morte celular causada pelo ATP. A linhagem SiHa apresentou uma quantidade significativa de RNAm do receptor P2X7 quando comparado á outras linhagens de câncer cervical (HeLa e C33A) e à linhagem de queratinócito imortalizado (HaCaT). Ainda, as células SiHa resistentes ao tratamento com ATP apresentaram menor expressão proteica do receptor P2X7.

Conclusão: Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que o ATP é citotóxico para a linhagem celular de câncer cervical SiHa e que esse processo

parece ser por apoptose via receptor P2X7. Ainda, que as células sobreviventes ao tratamento com ATP apresentam menor expressão de receptor P2X7, demonstrando um possível papel deste receptor na resistência tumoral. Entretanto, estudos futuros são necessários a fim de elucidar o papel do sistema purinérgico no desenvolvimento do câncer cervical e seu possível potencial terapêutico nesta neoplasia.

PALAVRAS-CHAVE: Nucleotídeos de Adenina, Receptor P2X7, Câncer Cervical, Apoptose.

SIGLAS:

ATP: adenosina trifosfato

ATCC: American Type Culture Collection

MTT: brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio

LDH: Lactato Desidrogenase

IP: Iodeto de Propídeo

BzATP: Benzoil ATP

oATP: ATP oxidado

IV. Discussão Geral

O papilomavírus humano (HPV) é um agente infeccioso transmitido principalmente por via sexual e seu envolvimento com o desenvolvimento de uma variedade de lesões pré-malignas e câncer cervical já é bem conhecida (Liu *et al.*, 2000). Mais de 100 subtipos de HPV têm sido identificados (Woodman *et al.*, 2007). De acordo com seu potencial oncogênico, os subtipos de HPV são classificados em três grupos: de baixo, médio e alto risco, os quais são frequentemente associados às lesões intraepiteliais e neoplasias invasoras do colo uterino. Os HPVs de alto risco são ligados ao surgimento de 95% dos carcinomas cervicais, tais como os HPV 16 e 18, que são os mais frequentemente detectados (Roden & Wu, 2006).

No entanto, somente a infecção permanente pelo vírus HPV não é suficiente para promover o desenvolvimento do câncer cervical. Sabe-se que, para a gênese de um processo neoplásico, são necessárias alterações em processos intrínsecos como proliferação, diferenciação, morte celular programada e capacidade de controle do micro ambiente (Figura 4). Desta forma, a análise da proliferação celular e dos eventos relacionados à apoptose são ferramentas importantes para conhecer o comportamento das células tumorais.

Como a sinalização purinérgica está sabidamente envolvida nestes processos, na epiderme humana, (Abbracchio & Burnstock, 1998; Burnstock, 2002) pode-se sugerir que este sistema esteja intimamente relacionado ao desenvolvimento do câncer cervical e que, portanto o entendimento do seu funcionamento nessa patologia permitiria a abordagem de novas estratégias terapêuticas e a identificação de novos alvos moleculares.

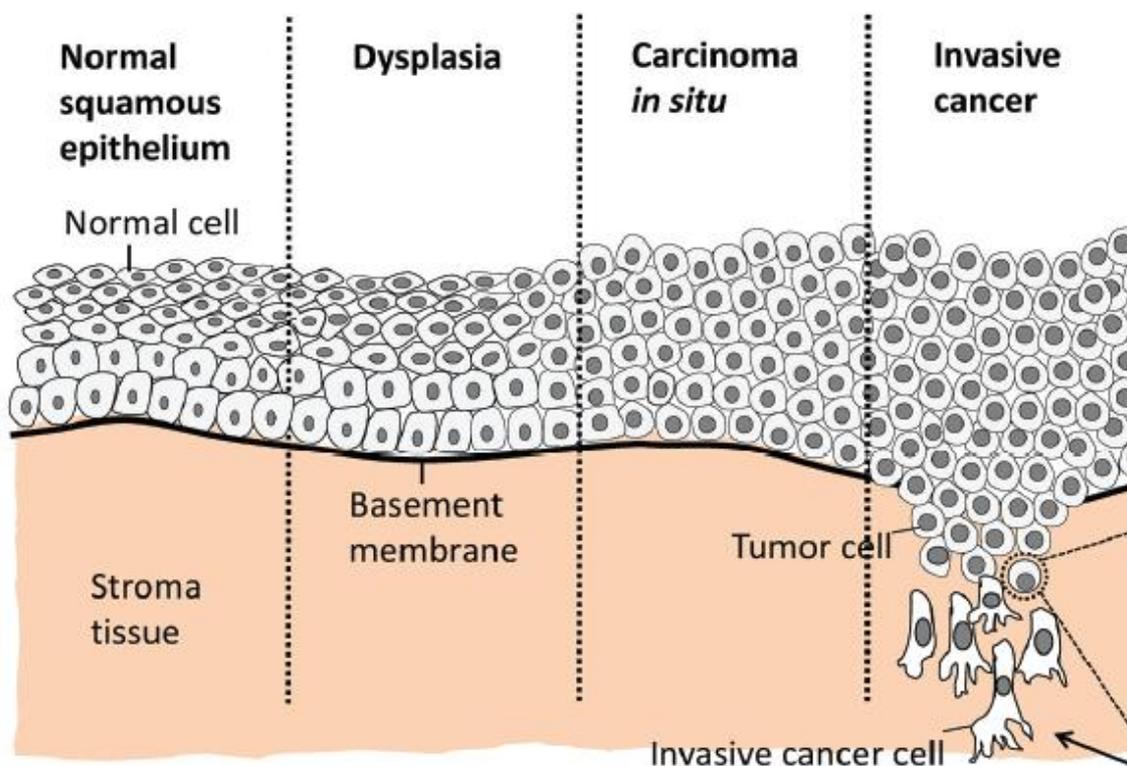


Figura 4. Etapas do desenvolvimento do câncer cervical escamoso. A progressão ocorre a partir do epitélio escamoso normal infectado pelo HPV, passando a displasia, carcinoma *in situ* e finalmente a câncer invasivo. Adaptado de Lee e Shen (2012). Cópia autorizada pela *American Journal of Translation Research*.

No epitélio estratificado escamoso do colo uterino, os purinoceptores estão distribuídos de forma diversificada entre as camadas do epitélio, sendo que a ação resultante da interação receptor - agonista vai depender do tipo de receptor, do tipo do agonista e da região do estrato epitelial. Adenosina, dependendo do tipo de receptor P1 ativado (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), pode causar ação proliferativa ou apoptótica. No entanto, este nucleosídeo não parece exercer um papel tão importante no tropismo celular quanto o ATP, que via receptores P2, parece ser o maior responsável pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose (Burnstock *et al.*, 2012). Os receptores $P2Y_1$ e $P2Y_2$ são encontrados nas camadas basais do epitélio e quando ativados pelo ATP promovem a proliferação celular. Já nas camadas intermediárias e superiores, encontra-se o predomínio do receptor $P2X_5$, que é conhecido por estimular a diferenciação celular. Envolvido com o processo de diferenciação celular terminal, apoptose e queratinização, nas camadas mais superficiais do epitélio estratificado, encontra-se o receptor $P2X_7$, que é o único purinoceptor que

apresenta capacidade de formar canais permeáveis a pequenos cátions e de formar grandes poros que permitem a entrada de molécula hidrofílicas maiores que 900 Da. A abertura destes poros promove a entrada de cálcio livre intracelular com conseqüente morte por apoptose (Burnstock *et al.*, 2012). Sendo assim, entende-se que o sistema purinérgico está fortemente envolvido com a homeostase do tecido epitelial cervical normal e que uma alteração nesse sistema pode contribuir com a formação de um processo neoplásico.

Uma sinalização autócrina-parácrina mediada por ATP extracelular via ativação dos receptores P2X7 em células epiteliais normais da ectocérvice humana já foi descrita por Wang e colaboradores (2005). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que o tratamento das células com apirase atenuava o índice apoptótico basal, sugerindo a ação do ATP extracelular no controle desse processo. Ainda, verificou-se que a exposição das células ao ATP e ao BzATP, agonista seletivo do P2X7, aumentava significativamente a morte celular por apoptose e que esse processo ocorria via aumento do cálcio intracelular e ativação da via intrínseca (mitocondrial) das caspases, reforçando mais uma vez o envolvimento do sistema purinérgico no controle da morte celular do epitélio cervical normal.

Além da ação descrita no epitélio cervical, muitos estudos têm demonstrado que altas concentrações de ATP extracelular podem induzir morte em outros tipos celulares (Morrone *et al.*, 2005; Di Virgilio, 2000), inclusive em células tumorais. Entretanto, estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer mostram resultados controversos quanto ao efeito citotóxico do ATP. Esse efeito parece ser dependente do tipo celular e do purinoceptor predominante no tecido. Por exemplo, em células de carcinoma escamoso, os receptores P2X5, P2X7 e P2Y₂ foram identificados, sendo o primeiro responsável pela diferenciação, o segundo pela apoptose e o terceiro pela proliferação. A proporção de cada receptor no tecido e a quantidade de agonista disponível irá determinar se o tumor irá proliferar ou entrar em apoptose. Em tumores urológicos, como o de bexiga e próstata, e tumores ginecológicos, como o de cérvice uterina e do endométrio, já foram descritas

ações anti-proliferativas, pró-apoptóticas e pró-necróticas em várias linhagens celulares, via ativação dos receptores P2 (Deli & Csernoch, 2008).

Resultados controversos também foram demonstrados recentemente por Adinolfi (2012), que identificou o envolvimento do receptor P2X7 na proliferação tumoral *in vivo*. Os autores verificaram que os tumores contendo alta expressão deste receptor apresentavam alta taxa de proliferação, redução no processo de apoptose e secretavam altas quantidades de VEGF quando comparados aos tumores sem ou com baixa expressão de P2X7. Ainda, o uso do antagonista do receptor P2X7, o ATP, e do anticorpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab, reduzia significativamente o tamanho dos tumores. Esses resultados trazem uma nova abordagem sobre a importância do receptor P2X7 no desenvolvimento tumoral, indicando uma ação proliferativa a um receptor classicamente conhecido pela sua ação citotóxica (Adinolfi *et al.*, 2012).

Considerando evidências de que um desequilíbrio no sistema purinérgico possa estar envolvido com o desenvolvimento do câncer, o presente estudo objetivou identificar a relação entre esse sistema e o câncer cervical, representado aqui por uma linhagem celular humana de câncer cervical, SiHa. Para isso, foi avaliado o efeito citotóxico do ATP extracelular e o papel do receptor P2X7 nessa linhagem, com o intuito de identificar novos alvos terapêuticos no tratamento desta neoplasia.

No capítulo 1 desta dissertação, visando avaliar o efeito dos nucleotídeos de adenina na morte celular e o papel do receptor P2X7 nesse processo, foi utilizada a linhagem celular SiHa (ATCC) de câncer cervical, que contém o vírus HPV 16 incorporado ao seu genoma. As células foram primeiramente incubadas com diferentes concentrações de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e do nucleosídeo adenosina por 24h. Dentre todos os compostos e concentrações testadas, o ATP e a adenosina 5mM foram os que induziram a maior morte celular.

Muitos estudos mostram que a adenosina pode causar morte por apoptose em uma variedade de células tumorais. Segundo esses estudos, a adenosina extracelular pode atuar de duas formas, uma, por meio de transportadores específicos, sendo internalizada na célula, e outra, se ligando aos receptores de membrana A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 . Dependendo do tipo celular, a adenosina pode desencadear apoptose via ativação das caspases ou por meio de vias independentes (Tsuchiya *et al.*, 2012). De qualquer forma, o mecanismo pelo qual a adenosina causa morte celular na linhagem SiHa permanece desconhecido, e será foco de estudos futuros do nosso laboratório.

Com relação ao efeito citotóxico causado pelo ATP 5mM, dados da literatura demonstram que concentrações milimolares são necessárias para que ocorra uma interação efetiva entre o ATP e o receptor P2X7, resultando na abertura dos grandes poros e consequente morte celular (Gehring *et al.*, 2012). Além disso, este efeito já foi demonstrado em linhagens celulares de câncer de próstata, mama, bexiga, ovário, células leucêmicas e gliomas (Deli & Csernoch, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Tamajusuko *et al.*, 2010; Gehring *et al.*, 2012).

O tempo de interação entre o receptor P2X7 e o ATP também é importante para o processo de morte celular. Para isso, foi determinada a viabilidade celular após o tratamento com 5mM de ATP por 24, 48 e 72h. Um aumento na morte celular foi observado em função do tempo, sendo que em 72h houve uma redução de aproximadamente 80% na viabilidade celular, confirmando a necessidade de uma interação prolongada do ATP com os receptores P2X7. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o receptor P2X7 apresentar baixa afinidade pelo ATP ($EC_{50} = 300-400\mu\text{M}$) e, portanto, necessitar de uma exposição longa e a altas concentrações dessa molécula para que ocorra a formação de poros, a passagem de grandes moléculas e por fim a morte celular (Ferrari *et al.*, 1999, Burnstok *et al.*, 2012).

A avaliação do metabolismo do ATP extracelular após tratamento foi verificada por meio da análise do meio reacional por HPLC. Como o esperado, todo o ATP foi consumido durante as 72h e concentrações muito baixas dos seus produtos de degradação ADP, AMP, adenosina, inosina e hipoxantina

foram encontrados. Nota-se também que foram nas primeiras 24h que ocorreu a maior queda da concentração do ATP, sugerindo que este é o tempo necessário para o ATP desencadear os seus efeitos tardios na morte celular. Essa degradação, apesar de ser mais pronunciada nas primeiras 24h, ocorre de uma forma moderada, o que corrobora aos resultados encontrados por nosso grupo de que a linhagem SiHa exibe uma baixa atividade das NTPDases 1 e 2 (*dados não publicados*), que são as principais enzimas que degradam o ATP extracelular. Estes resultados indicam que, nas condições do estudo, o efeito de indução da morte celular, da linhagem SiHa, foi promovido pelo ATP.

A redução na viabilidade celular após exposição aguda ao ATP 5mM foi demonstrada pela técnica do MTT, que mede a viabilidade mitocondrial, e pela contagem celular com Trypan Blue, que cora as células mortas. Além disso, o efeito do ATP em longo prazo, inibindo a capacidade de proliferação das células remanescentes após o tratamento, foi realizado por meio do ensaio clonogênico. Essa técnica permite avaliar a capacidade de uma única célula de se proliferar e formar colônia após exposição a um agente citotóxico (Franken *et al.*, 2006). Após tratamento com ATP verificou-se que este inibe, significativamente, em função do tempo, a capacidade proliferativa das células remanescentes. Com isso, conclui-se que o ATP, além de induzir a morte celular direta, impede a proliferação das células remanescentes, resistentes ao tratamento agudo.

Estudos demonstram que o ATP, via ativação do receptor P2X7, pode causar morte de vários tipos celulares por meio de mecanismos que envolvam os processos de necrose ou apoptose. Enquanto o primeiro é caracterizado pelo inchaço celular e a perda da integridade da membrana plasmática, o segundo é representado pelo encolhimento celular, presença de corpos apoptóticos e a externalização da fosfatidilserina (Tamajusuko *et al.*, 2010; Gehring *et al.*, 2012). Sendo assim, o próximo passo foi determinar o mecanismo pelo qual esse nucleotídeo causa a morte celular da linhagem SiHa. Para tanto, foram investigados os processos de necrose e apoptose, utilizando os testes da lactato desidrogenase (LDH) e da marcação dupla com

Anexina V e iodeto de propídeo (IP) por citometria de fluxo. A dosagem da enzima LDH é um método amplamente utilizado como triagem para a determinação de dano celular. Visto que a LDH é uma enzima exclusivamente intracelular, a sua determinação no meio de incubação representa o rompimento das células com consequente liberação para o meio extracelular. Uma forma mais específica para diferenciar entre os mecanismos de morte celular por necrose ou apoptose é a marcação das células com Anexina V e IP. O IP é uma molécula grande, que só consegue penetrar na célula, se ligar ao DNA e emitir fluorescência quando ocorre a ruptura celular, representando a morte por necrose. Já a Anexina V é um fosfolípídeo que se liga a fosfatidiserina translocada para o lado externo da membrana citoplasmática durante o processo de apoptose (Vermes *et al.*, 1995). Para a determinação da LDH, as células foram incubadas com 5mM ATP por 24, 48 e 72h e após este período a dosagem de LDH foi feita no meio reacional. Apesar de alguns estudos mostrarem que o ATP causa a morte celular via necrose (Coutinho-Silva *et al.*, 2005; Tamajusuko *et al.*, 2010), a linhagem SiHa não apresentou rompimento agudo da membrana plasmática após exposição ao ATP, sendo que somente após 72h uma quantidade significativa de LDH foi liberada ao meio. Para a determinação da marcação com Anexina V e IP, as células foram tratadas da mesma forma e após o tempo de incubação, foram marcadas com Anexina V-FITC e IP e avaliadas por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que o ATP provoca uma redução no tamanho das células e um aumento na marcação de Anexina V, enquanto o IP não se alterou. Isso sugere que o ATP promoveu morte celular via apoptose e que a liberação significativa de LDH após 72h possa representar uma apoptose tardia. De acordo com estes resultados, análise morfológica das células após tratamento com ATP apresentou estruturas celulares com características de processo apoptótico, como encolhimento celular e a formação de vesículas na membrana, chamadas de corpos apoptóticos. Essas características morfológicas são semelhantes às encontradas após o tratamento com cisplatina, agente que sabidamente promove apoptose. Entretanto, o mecanismo intracelular pelo qual o ATP induz apoptose na linhagem SiHa ainda não foi determinado. Segundo a literatura, o principal mecanismo pelo qual o ATP ou BzATP

promove apoptose via ativação do receptor P2X7 é por meio da abertura dos poros na membrana plasmática, seguido de influxo de cálcio intracelular, com consequente ativação da via mitocondrial (intrínseca) das caspases (caspase-9) (Wang *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2009). Sendo assim, estudos futuros, avaliando o efeito da privação de cálcio no meio extracelular e dos inibidores de caspases na morte celular induzida por ATP, se fazem necessários para esclarecer se a indução de apoptose na linhagem SiHa ocorre da mesma forma que nas células epiteliais cervicais normais e da pele, conforme dados da literatura.

A fim de verificar se o efeito citotóxico induzido pelo ATP na linhagem celular SiHa, seria mediado pelo receptor P2X7, foi avaliado o efeito de um agonista e um antagonista deste receptor na viabilidade celular. O BzATP, um agonista seletivo do receptor P2X7, induziu a morte celular de forma dose dependente, sendo 100µM a concentração efetiva em que aproximadamente 50% das células foram mortas. Já o oATP, um antagonista do P2X7, conseguiu reverter significativamente, mas parcialmente o efeito citotóxico do ATP. Esse efeito parcial se justifica pelo fato do oATP ser um antagonista não seletivo, de amplo espectro. Se o ATP realmente promove o seu efeito via P2X7, um bloqueio total do efeito seria esperado por um antagonista seletivo ou por meio do silenciamento do gene P2X7. Com a finalidade de comprovar a ação via P2X7, estudos futuros irão envolver o uso do antagonista seletivo do receptor P2X7, A74003, e células SiHa silenciadas para o gene deste receptor.

O uso de BzATP como uma nova modalidade terapêutica na prevenção do crescimento celular e evolução de papilomas a câncer de pele, *in vivo*, já foi descrito por Fu e colaboradores (2009). Nesse trabalho, a indução de papilomas e do câncer de pele foi feita por meio da aplicação local com 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). O tratamento prévio dos camundongos com BzATP reduziu a indução de formação do câncer de pele e dos papilomas pelo DMBA/TPA. Além disso, os autores verificaram que o grau de apoptose celular causado pelo BzATP era menor no tecido tumoral maligno do que no benigno (papilomas), o que foi explicado pelos menores níveis de proteína e RNAm do receptor P2X7

encontrados no tecido cancerígeno comparado ao tecido normal. Esses resultados revelam a importância do mecanismo de apoptose mediado pelo receptor P2X7 no controle do desenvolvimento e progressão de câncer. Além disso, muitos outros estudos revelam diferenças na expressão do receptor P2X7 entre tecidos normais e tumorais (Greig *et al.*, 2003b, Li *et al.*, 2006 Li *et al.*, 2009) sendo a expressão reduzida deste receptor uma característica de células pré-malignas e malignas. Isso indica um papel importante do P2X7 no controle e no desenvolvimento do câncer e sua redução representa um mecanismo de defesa e resistência das células tumorais a morte celular.

Visando avaliar o perfil de expressão do receptor P2X7 entre as diferentes linhagens celulares de câncer cervical, SiHa (HPV16+), HeLa (HPV18+), C33A (sem cópias do HPV) e a linhagem celular epitelial humana HaCaT (controle não tumoral), foram realizadas as técnicas de RT-PCR e *real time* PCR. Verificou-se que a expressão do RNAm varia entre as linhagens celulares, sendo a SiHa a linhagem com maior expressão deste receptor. Um ponto importante a ser abordado aqui, refere-se ao tipo de receptor que está sendo determinado. Em 2006, Freng e colaboradores, descobriram uma forma truncada do receptor P2X7 (P2X7-j) que se expressa endogenamente na membrana plasmática das células de câncer cervical, é inativo e ainda, se polimeriza com o receptor P2x7 funcional (full-leght) bloqueando a sua ação. O *primer* utilizado no presente trabalho identifica o receptor funcional (full-leght). Isso justifica a ausência de RNAm na linhagem HeLa, que sabidamente expressa apenas a forma truncada desse receptor (Welter-Stahl *et al.*, 2009).

Considerando que estudos demonstram uma redução na expressão do receptor P2X7 nos tecidos tumorais, sugerindo um mecanismo de resistência celular à apoptose, foi avaliada a expressão deste receptor nas células SiHa aderidas, resistentes à morte celular, após tratamento com ATP. As células foram tratadas de duas formas distintas: (1) incubadas com 5mM de ATP por 24, 48 e 72h e em seguida a expressão da proteína foi determinada por Western Blot (WB) e (2) após tratamento das células com ATP 5mM por 24, 48 e 72h, o meio foi retirado e as células resistentes foram “recuperadas” até

confluência com meio padrão de cultivo, sendo então realizado o WB. Como o esperado, as células resistentes ao tratamento por ATP apresentaram menor expressão do receptor P2X7 quando comparadas ao controle de células não expostas. Ainda, as células mais resistentes, que sobreviveram por 72h de tratamento, apresentaram a menor expressão de receptor, reforçando a importância deste como um marcador de agressividade tumoral.

Nesse estudo, identificamos, pela primeira vez, que a linhagem celular de câncer cervical SiHa é suscetível ao efeito citotóxico do ATP. Este efeito parece ser mediado via receptor P2X7 por meio da indução de apoptose. Estes resultados podem indicar este nucleotídeo como potencial agente adjuvante na quimioterapia tradicional no tratamento do câncer cervical. Ainda, verificamos que as células resistentes ao tratamento com ATP, apresentam menor expressão proteica do receptor P2X7, indicando ter este receptor uma possível aplicação como alvo terapêutico ou ainda como marcador prognóstico.

V. Conclusões gerais

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. ATP extracelular, na concentração de 5mM, provoca a morte celular na linhagem de carcinoma cervical SiHa, de forma tempo dependente;
2. O ATP, além de causar a morte celular direta, diminui a capacidade das células sobreviventes, após tratamento, de formarem colônias, ou seja, de se proliferarem a longo prazo a partir de uma única célula-mãe;
3. ATP parece atuar via receptor P2X7, causando morte celular por apoptose;
4. A expressão do receptor P2X7 varia entre as linhagens celulares de câncer cervical e a linhagem não tumoral HaCaT, sendo expresso em maior concentração na linhagem celular SiHa;
5. As células SiHa sobreviventes ao efeito citotóxico causado pelo ATP têm expressão diminuída de P2X7 em sua membrana, indicando um mecanismo de resistência celular à morte por apoptose;
6. O ATP poderá ser sugerido como terapia alternativa no tratamento do câncer cervical em associação com as quimioterapias tradicionais;
7. O receptor P2X7 poderá ser um potencial alvo molecular prognóstico para o câncer cervical.

VI. Perspectivas

No sentido de melhor compreender o mecanismo de ação pelo qual o ATP induz apoptose na linhagem SiHa e o papel do receptor P2X7 no desenvolvimento do carcinoma cervical humano, algumas perspectivas são sugeridas:

1. Investigar se o ATP, via ativação do P2X7, promove influxo de cálcio e ativação da via intrínseca (mitocondrial) das caspases, uma vez que é o mecanismo mais comum de indução de apoptose via ativação do P2X7 descrito na literatura. Para isso, serão utilizados o agente quelante de Cálcio EGTA e o inibidor da caspase-3 no meio extracelular e a morte celular será avaliada com marcação de Anexina V e IP por citometria de fluxo.
2. Avaliar o efeito do ATP em células SiHa silenciadas para o gene do receptor P2X7;
3. Comparar a resistência ao medicamento quimioterápico cisplatina e a capacidade de proliferação pela medida da expressão do Ki-67 entre as linhagens celulares SiHa normais e silenciadas para o gene da P2X7;
4. Avaliar o efeito do ATP e a expressão do receptor P2X7 em culturas de queratinócitos humanos normais e transfectados com as oncoproteínas E6 e ou E7 do vírus HPV 16;
5. Avaliar o efeito dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e do nucleosídeo adenosina, na proliferação e morte celular, em outras linhagens celulares de carcinoma cervical, HeLa e C33A;
6. Realizar estudos *in vitro* utilizando culturas organotípicas, a fim de avaliar o efeito citotóxico do ATP no tecido epitelial cervical estratificado, multicelular e suas interações.

7. Realizar estudos *in vivo*, por meio da indução de tumores em camundongos imunodeficientes do tipo nude (BALB/c nu-nu). Avaliar nesse modelo o efeito do ATP no crescimento e morte tumoral, bem como a expressão do receptor P2X7 nos tecidos tumorais formados e adjacentes ao tumor.

VII. Referências

- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology*, v.78, p.113-145, 1998.
- ADINOLFI, E.; RAFFAGHELLO, L.; GIULIANI, A. L.; CAVAZZINI, L.; CAPECE, M.; CHIOZZI, P.; BIANCHI, G.; KROEMER, G.; PISTOIA, V.; DI VIRGILIO, F. Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. *Cancer Research*, v.72, n.12, p.2957-69, 2012.
- AIRAS, L.; NIEMELA, J.; SALMI, M.; PUURUNEN, T.; SMITH, D. J.; JALKANEN, S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, v.136, p. 421-431, 1997.
- BICALHO, S. M.; ALEIXO, J. L. M. O Programa "Viva Mulher": programa nacional de controle do câncer de colo uterino e de mama. *Revista Mineira de Saúde Pública*, 2002.
- BROWN, C.; KOWALCZYK, A. M.; TAYLOR, E. R.; MORGAN, I. M.; GASTON, K. P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virology Journal*, v.5, p.5, 2008.
- BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in Pharmacology*, v. 39, p. 353-391, 1997.
- BUFFON, A.; RIBEIRO, V. B.; FÜRSTENAU, C. R.; BATTASTINI, A. M. O.; SARKIS, J. J. F. Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from adult rats. *Clinica Chimica Acta*, v.349, p.53-60, 2004.
- BUFFON, A.; RIBEIRO, V. B.; SCHANOSKI, A. S.; SARKIS, J. J. F. Diminution in adenine nucleotide hydrolysis by platelets and serum from rats submitted to Walker 256 tumour. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 281, p.189-195, 2006.
- BUFFON, A.; RIBEIRO, V. B.; WINK, M. R.; CASALI, E. A.; SARKIS, J. J. F. Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. *Life Sciences*,v.80, p.950-958, 2007a.
- BUFFON, A.; WINK, M. R.; RIBEIRO, B. V.; CASALI, E. A.; LIBERMANN, L. F.; ZERBINI, L. F.; ROBSON, C. S.; SARKIS, J. J. F. NTPDases and ecto-5'-nucleotidase expression profile and ATP metabolism in Walker 256 tumor-bearing rats is modified during in vivo growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1770, p.1259-1265, 2007b.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews*. v.58, p.58-86, 2006.
- BURNSTOCK, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clinical Medicine*, v. 2, p. 45-55, 2002.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E.; GREIG, A. V. H. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v.132, p.526-546, 2012.

- CANBOLAT, O.; DURAK, I.; CETIN, R.; KAVUTCU, M.; DEMIRCI, S.; OZTURK, S. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 37, p.189-93, 1996.
- CARDEAL, L. B. S.; BOCCARDO, E.; TERMINI, L.; RABACHINI, T.; ANDREOLI, M. A.; DI LORETO, C.; FILHO, A. L.; VILLA, L. L.; MARIA-ENGLER, S. S. HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. *Plos One*, v.7, n.3, 2012.
- CHUNG, T. K.; CHEUNG, T. H.; LO, W. K.; YIM, S. F.; YU, M. Y.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; WONG, Y. F. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Letters*, v.180, p.63-8, 2002.
- COMMUNI, D.; GONZALEZ, N. S.; DETHEUX, M.; BRÉZILLON, S.; LANNOV, V.; PARMENTIER, M.; BOEYNAEMS, J. M. Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.41479-41485, 2001.
- COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.; BISAGGIO, R. D.; PERFETTINI, J. L.; NETO, A. C.; KANELLOPOULOS, J. M.; MOTTA-LY, I.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D. M.; P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *The American Journal of Physiology*, v.276, p.C1139-47, 1999.
- CZAJKOWSKI, R.; BARANSKA, J. Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochimica Polonica*, v.49, p.877-889, 2002.
- DZHANDZUGAZYAN, K. N.; KIRKIN, A. F.; STRATEN, P. T.; ZEUTHEN, J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Letters*, v. 430, p. 227-230, 1998.
- DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 81, p.59-63, 2000.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic signaling*, v.1, p.205-209, 2005.
- DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J. M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O. R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, v.97, p.587-600, 2001.
- DI VIRGILIO, F.; PIZZO, P.; ZANOVELLO, P.; BRONTE, V.; COLLAVO, D. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*, v.11, p.274-277, 1990.
- DUGGAN, M. A. A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy*, v.29, p.176-93, 2002.

- FENOGLIO, C.; NECCHI, D.; CIVALLERO, M.; CERONI, M.; NANO, R. Cytochemical demonstration of nitric oxide syntase and 5'-nucleotidase in human glioblastoma. *Anticancer Research*, v. 17, p. 2507-2511, 1997.
- FERRARI, D.; LOS, M.; BAUER, M. K.; VANDENABEELE, P.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Letters*, v.447, p.71-75, 1999.
- FLOCKE, K.; MANNHERZ, H. G. Isolation and characterization of 5'-nucleotidase of a human pancreatic tumor cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1076, p. 273-81, 1991.
- FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.87, p.8267-8271, 1990.
- FILIPPOVA, M.; FILIPPOV, V. A.; KAGODA, M.; GARNETT, T.; FODOR, N.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Complexes of Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Form Pseudo-Death-Inducing Signaling Complex Structures during Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis. *Journal of Virology*, v. 83, n.1, p.210-227, 2009.
- FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v. 1, n.5, p.2315-2319, 2006.
- FU, W.; McCORMICK, T.; QI, X.; LUO, L.; ZHOU, L.; LI, X.; WANG, B. C.; GIBBONS, H. E.; ABDUL-KARIM, F. W.; GORODESKI, G. I. Activation of P2X7-mediated apoptosis Inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer*, v.9, p.114, 2009.
- GEHRING, M. P.; PEREIRA, T. C. B.; ZANIN, R. F.; BORGES, M. C.; FILHO, A. B.; BATTASTINI, A. M. O.; BOGO, M. R.; LENZ, G.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signalling*, 2012.
- GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1638, p. 1-19, 2003.
- GREIG, A. V.; CUTHILL, S.; LINGE, C.; CLAYTON, E.; BURNSTOCK, G. P2X5 and P2X7 receptors in human warts and CIN 612 organotypic raft cultures of human papillomavirus infected keratinocytes. *Purinergic Signalling*, v.2, p.509-515, 2006.
- GREIG, A. V.; LINGE, C.; TEREINGHI, G.; MCGROUTHER, D. A. BURNSTOCK, G. Purinergic receptors are part of a functional signalling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.120, p.1007-15, 2003a.

- GREIG, A. V.; LINGE, C.; HEALY, V.; LIM, P.; CLAYTON, E.; RUSTIN, M. H.; MCGROUTHER, D. A.; BURNSTOCK, G. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.121, p.315-27, 2003b.
- GOODMAN, A.; WILBUR, D. C. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *The New England Journal of Medicine*, v.349, p.1555–1564, 2003.
- GUTENSOHN, W.; THIEL, E.; EMMERICH, B. Evaluation of 5'-nucleotidase a biochemical marker in leukemias and lymphomas. *Klinische Wochenschrift*, v. 61, p. 57-62, 1983.
- HARADA, H.; CHAN, C. M.; LOESCH, A.; UNWIN, R.; BURNSTOCK, G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney International*, v.57, p.949-958, 2000.
- HARTMANN, K.E.; HALL, S.A.; MYERS, E. *Screening for Cervical Cancer – Agency for Healthcare Research and Quality*. 2002.
- HOLLOPETER, G.; JANTZEN, H. M.; VINCENT, D.; LI, G.; ENGLAND, L.; RAMAKRISHNAN, V.; YANG, R. B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.; JULIUS, D.; CONLEY, P. B. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, v.409, p.202-207, 2001.
- HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 protein. *Virology*, v.384, n.2, p.324-334, 2009.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do Câncer, Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>>. Acesso em: 12 jul. 2012.
- KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood*, v. 96, p. 2157-2162, 2000.
- KITTEL, A.; GARRIDO, M.; VARGA, G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 50, p. 549-556, 2002.
- KITTEL, A.; VARGA, G.; LISCOVITCH, M. Ecto-ATPases and caveolae in multidrug-resistant cancer cells. *The European Journal of Neuroscience*, v. 12, p. 225, 2000.
- KNOWLES, A. F.; CHIANG, W. C. Enzymatic and transcriptional regulation of human ecto-ATPase/E-NTPDase 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 418, p. 217-227, 2003.

- LAZAROWSKI, E. R.; SESMA, L. I.; SEMINARIO-VIDAL, L.; KREDA, S. M. Molecular Mechanisms of Purine and Pyrimidine Nucleotide Release. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J.; ENNA, S. J. Pharmacology of Purine and Pyrimidine Receptors. *Advances in Pharmacology*, v. 61, 2011.
- LEE, M. Y.; SHEN, M. R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *American Journal of Translational Research*, v.4, n.1, p.1-13, 2012.
- LEDUR, P. F.; VILLODRE, E. S., PAULUS, R.; CRUZ, L. A.; FLORES, D. G.; LENZ, G. Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signalling*, v. 8, p.39-48, 2012.
- LI, X.; QI, X.; ZHOU, L.; FU, W.; ABDUL-KARIM, F. W.; MACLENNAN, G.; GORODESKI, G. I. P2X7 receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signalling*, v.5, p.351–368, 2009.
- LI, X.; ZHOU, L.; FENG, Y. H.; ABDUL-KARIM, F. W.; GORODESKI, G.I. The P2X7 Receptor: A Novel Biomarker of Uterine Epithelial cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v.15, n.10, p.1906-1913, 2006.
- LIU, Y.; MCKALIP, A.; HERMAN, B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.78, p.334–49, 2000.
- LORENZATTO, M.; CAUDROY, S.; BRONNER, C.; EVRARD, G.; SIMON, M.; DURLACH, A.; BIREMBAUT, P.; CLAVEL, C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Human Pathology*, v.36, p.1101-7, 2005.
- MORRONE, F. B.; JACQUES-SILVA, M. C.; HORN, A. P.; BERNARDI, A.; SCHWARTSMANN, G.; RODNIGHT, R.; LENZ, G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-oncology*, v.64, p.211-8, 2003.
- MORRONE, F. B.; HORN, A. P.; STELLA, J.; SPILLER, F.; SARKIS, J. J.; SALBEGO, C. G.; LENZ, G.; BATTASTINI, A. M. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *Journal of Neuro-oncology*, v.71, p.135-40, 2005.
- MORRONE, F. B.; OLIVEIRA, D. L.; GAMERMANN, G.; STELLA, J.; WOFCHUK, S.; WINK, M. R.; MEURER, L.; EDELWEISS, M. I. A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A. M. O. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*, v.6, p.226, 2006.
- NAM, S. W.; CLAIR, T., KIM, Y. S. MCMARLIN, A.; SCHIFFMANN, E.; LIOTTA, L. A.; STRACKE, M. L. Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Research*, v. 61, p. 6938-6944, 2001.

- PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, v.80, p.827-41, 1999.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News & Perspectives*, v.16, p.133-140, 2003.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, v.50, p.413-92, 1998.
- RAPAPORT, E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *Journal of Cell Physiology*, v.114, p.279-283, 1983.
- RAPP, L.; CHEN, J. J. The papillomavirus E6 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1378, p.F1-F19, 1998.
- RODEN, R.; WU, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature Reviews.Cancer*. v.6, p.753-63, 2006.
- RODRIGUEZ-NIETO, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Current Pharmaceutical Design*, v.12, p.4411-25, 2006.
- SADEJ, R.; SPYCHALA, J.; SKLADANOWSKI, A. C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Research*, v. 16, p.213 -22, 2006.
- SAKURA, H.; NAGASHIMA, S.; NAKASHIMA, A.; MAEDA, M. Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thrombosis research*, v. 91, p. 83-89, 1998.
- SAPHNER, T.; TORMCY, D .C.; GRAY, R. Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 9, p. 2294-2886, 1991.
- SCHEFFNER, M.; MÜNGER, K.; BYRNE, J. C.; HOWLEY, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, v. 88, p.5523-5527, 1991.
- SPRANZI, E.; DJEU, J. Y.; HOFFMAN, S. L.; EPLING-BURNETTE, P. K.; BLANCHARD, D. K. Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor. *Blood*, v.82, p.1578-1585, 1993.
- STEFAN, C., JANSEN, S., BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 30, p. 542-550, 2005.

- STEFAN C., JANSEN S., BOLLEN M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling*, v. 2, p. 361-370, 2006.
- STRACKE M.L., KRUTZSCH H.C., UNSWORTH E.J., ARESTAD A., CIOCE V., SCHIFFMANN E., LIOTTA L.A. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulation protein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 2524-2529, 1992.
- TAMAJUSUKU, A. S. K.; VILLODRE, E. S.; PAULUS, R.; COUTINHO-SILVA, R.; BATASTINI, A. M. O.; WINK, M. R.; LENZ, G. Characterization of ATP-induced Cell Death in the GL261 Mouse Glioma. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.109, p.983-91, 2010.
- TJALMA, W. A.; ARBYN, M.; PAAVONEM, J.; WAES, T. R.; BOGERS, J. J. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. v.14, p.751-61, 2004.
- TSUCHIYA, A.; KANNO, T.; SAITO, M.; MIYOSHI, Y.; GOTOH, A.; NAKANO, T.; NISHIZAKI, T. Intracellularly transported adenosine induces MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus. *Cancer Letters*, v.321, p.65-72, 2012.
- UJHAZY, P.; BERLETH, E. S.; PIETKIEWICZ, J. M.; KITANO, H.; SKAAR, J. R.; EHRKE, M. J.; MIHICH, E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *International Journal of Cancer*, v. 68, p. 493-500, 1996.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFEBEBS-NAKKEN H.; REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, v.184, p.39-51, 1995.
- VIEIRA, K. B.; GOLDSTEIN, D. J; VILLA, L. L. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. *Cancer Research*, v.56, p.2452-7, 1996.
- VON KUGELGEN, I.; WETTER, A. Molecular pharmacology of P2Yreceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.362, p.310-323, 2000.
- WANG, Q.; WANG, L.; FENG, Y-H.; LI, X.; ZENG, R. P2X7 receptor-mediated apoptosis of human epithelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 287, p.1349-1358, 2004.
- WEISMAN, G. A.; LUSTIG, K. D.; LANE, E.; HUANG, N.; BELZER, I.; FRIEDBERG, I. Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p.12367-12372, 1988.
- WELTER-STAHL, L.; SILVA, C. M.; SCHACHTER, J.; PERESECHINI, P. M.; SOUZA, H. S.; OJCIUS, D. M.; COUTINHO-SILVA, R. Expression of purinergic receptors and modulation

of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN γ in human epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1788, p.1176–1187, 2009.

WEN, L. T.; KNOWLES, A. F. Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor, *British Journal of Pharmacology*, v.140, p.1009-1018, 2003.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. *Trends in Pharmacological Science*, v.27, p.211-7, 2006.

WINK, M. R.; BRAGANHOL, E.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; LENZ, G.; ZERBINI, L. F.; LIBERMANN, T. A.; SÉVIGNY, J.; BATTASTINI, A. M. O.; ROBSON, S. C. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD391) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*, v.138, p.421-432, 2006.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews. Cancer*, v.7, p.11–22, 2007.

YANO, Y.; HAYASHI, Y.; SANO, K.; SHINMARU, H.; KURODA, Y.; YOKOZAKI, H.; YOON, S.; KASUGA, M. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 12, p. 763-766, 2003.

YANO, Y.; HAYASHI, Y.; SANO, K.; NAGANO, H.; NAKAJI, M.; SEO, Y.; NINOMIYA, T.; YOON, S.; YOKOZAKI, H.; KASUGA, M. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Letter*, v. 207, p. 139-147, 2004.

ZHANG, X.; MENG, L.; HE, B.; CHEN, J.; LIU, P.; ZHAO, J.; ZHANG, Y.; LI, M.; AN, D. The role of P2X7 receptor in ATP-mediated human leukemia cell death: calcium influx-independent. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v.41, p.362-369, 2009.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and Note on Nomenclature. *Drug Development Research*, v. 52, p. 44-56, 2001.